



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäÙ § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11) 208 609

Int.Cl.³ 3(51) C 07 C101/26

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) WP C 07 C/ 2410 896 (22) 25.06.82 (44) 04.04.84

(71) ADW DER DDR; DD;
(72) FAUST, JUERGEN, DR. DIPL.-CHEM.; SCHREIBER, KLAUS, PROF. DR. DIPL.-CHEM.;
PREISS, ALFRED, DR. DIPL.-CHEM.; RIPPERGER, HELMUT, DR. DIPL.-CHEM.; DD;
(73) siehe (72)
(74) ADW DER DDR, INST. F. BIOCHEMIE DER PFLANZEN DFS 4020 HALLE (SAALE) WEINBERG
3

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON POLYAMINOSAEUREN

(57) Es ist das Ziel der Erfindung, biologisch aktive Polyaminosäuren für die Praxis als Wirkstoffe zur Verfügung zu stellen. ErfindungsgemäÙ wird ein Gemisch eines Aminosäureesters der allgemeinen Formel I und eines Aldehydes der allgemeinen Formel II katalytisch hydriert, von der entstehenden Verbindung der allgemeinen Formel III die Schutzgruppen durch Hydrolyse entfernt, die so erhaltene Verbindung der allgemeinen Formel IV zusammen mit einem Aldehyd der allgemeinen Formel II in Gegenwart einer Base durch katalytische Hydrierung zur Verbindung der allgemeinen Formel V umgesetzt und diese zur entsprechenden Verbindung der allgemeinen Formel VI hydrolysiert. Die hergestellten Verbindungen sind für die Land-, Garten- und Forstwirtschaft sowie die Medizin von Interesse. Formeln I bis VI

THE BRITISH LIBRARY

24 APR 1984

SCIENCE REFERENCE LIBRARY

Verfahren zur Herstellung von Polyaminosäuren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Polyaminosäuren der allgemeinen Formel VI. Es handelt sich dabei um Nicotianamin und Analoga.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die hergestellten Verbindungen sind biologisch aktiv. Sie wirken als Metall-Carrier und sind deshalb für die Land-, Garten- und Forstwirtschaft sowie für die Medizin von Interesse.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß sich das biologisch aktive Nicotianamin (Formel VIa/1) durch Kochen von S-Azetidin-2-carbonsäure mit Natronlauge und anschließende aufwendige Reinigung in 4 % Ausbeute herstellen läßt (I. KRISTENSEN und P. O. LARSEN, *Phytochemistry* 13, 2791 (1974)). Eine weitere Synthese (S. FUSHIYA et al., *Heterocycles* 15, 819 (1981)) geht von (3S)-3-Benzylloxycarbonylamino-3-ethoxycarbonylpropionaldehyd aus, der mit S-Azetidin-2-carbonsäuremethylester in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid zu (2S:3'S)-N-(3-Amino-3-carboxypropyl)-azetidin-2-carbonsäure verknüpft wird. Die Umsetzung dieser Verbindung mit (3S)-3-Benzylloxycarbonylamino-3-tert-butoxycarbonylpropionaldehyd unter analogen Bedingungen liefert nach Abspaltung der Schutzgruppen Nicotianamin. Dieses Verfahren geht jedoch von Aldehyden aus, die nur durch eine komplizierte, vielstufige Synthese zugänglich sind.

Nur wenige Vertreter mit nicotianaminanaloger Struktur sind bekannt (H. RIPPERGER und K. SCHREIBER, *Heterocycles* 17, 447

(1982)). So wurde z. B. 2'-Desoxymugineinsäure synthetisiert, die sich von Nicotianamin durch Ersatz der primären Amino-
gruppe gegen eine Hydroxygruppe unterscheidet. Die ebenfalls
durch Synthese zugängliche Aveninsäure A besitzt statt des
Azetidinringes im Nicotianamin einen über das Stickstoffatom
verknüpften Homoserin-Rest.

Nicotianaminanaloge Polyaminosäuren der allgemeinen Formel VI
sind bisher nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, biologisch aktive Polyamino-
säuren für die landwirtschaftliche und medizinische Praxis
als Wirkstoffe zur Verfügung zu stellen, wobei bei Anwendung
in der Landwirtschaft die benötigte Aufwandmenge zur Erzie-
lung der Wirkung mit der von Phytohormonen in gleicher Grö-
ßenordnung liegen soll.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Ver-
fahren zur Herstellung von Polyaminosäuren der allgemeinen
Formel VI zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird ein Gemisch eines Aminosäureesters der
allgemeinen Formel I, vorzugsweise der Ethylester, und eines
Aldehydes der allgemeinen Formel II katalytisch hydriert. Von
der entstandenen Verbindung der allgemeinen Formel III werden
die Schutzgruppen durch alkalische oder saure Hydrolyse ent-
fernt. Die so erhaltene Verbindung der allgemeinen Formel IV
wird zusammen mit einem Aldehyd der allgemeinen Formel II in
Gegenwart einer Base, im allgemeinen einer tertiären Stick-
stoffbase, beispielsweise Triethylamin, erneut einer kataly-
tischen Hydrierung unterworfen. Dabei wird die entsprechende
Verbindung der allgemeinen Formel V hergestellt. Alkalische
Hydrolyse liefert schließlich die Verbindung der allgemeinen
Formel VI.

In den Formeln I bis VI bedeuten R^1 und R^2 unabhängig vonein-
ander Wasserstoff oder Alkyl ($C_1 - C_4$) bzw. gemeinsam Poly-

methylen ($C_2 - C_5$), R^3 steht für niederes Alkyl, vorzugsweise Ethyl, R^4 für Alkyl ($C_2 - C_4$), n für n_1 oder n_2 , wobei n_1 und n_2 unabhängig voneinander 1, 2, 3 oder 4, vorzugsweise 1 oder 2, bedeuten, und X für eine Schutzgruppe, die bei der Verknüpfung von Aldehyd- und Aminosäurekomponenten durch katalytische Hydrierung nicht abgespalten wird, insbesondere für den Trifluoracetylrest.

Die Ausgangsstoffe werden nach bekannten Verfahren synthetisiert (K.-H. DEIMER et al., in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl), 4. Auflage, Bd. XV/1, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1974, S. 315, und F. WEYGAND und H. FRITZ, Chem. Ber. 98, 72 (1965)).

Der bei beiden Hydrierungen als Reaktionspartner eingesetzte Aldehyd der allgemeinen Formel II ist entweder in beiden Reaktionsstufen der gleiche ($n_1 = n_2$) oder man wählt für jede Stufe einen anderen Aldehyd, wobei sich die beiden Aldehyde lediglich in der Anzahl der Methylengruppen unterscheiden ($n_1 \neq n_2$).

Die Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung des Aminosäureesters der allgemeinen Formel I zur Verbindung der allgemeinen Formel III und bei der Umsetzung der Verbindungen der allgemeinen Formel IV zu jenen der allgemeinen Formel V sind hinsichtlich Temperatur, Druck und Katalysator gleich. Man arbeitet in einem organischen Lösungsmittel, bevorzugt bei Raumtemperatur und Normaldruck, während als Katalysator insbesondere Palladium auf Aktivkohle (mit einem Gehalt von 10 % Palladium) verwendet wird. Als Lösungsmittel sind Alkohole, z. B. Methanol oder Ethanol, oder Lösungsmittelgemische geeignet.

Man hydrolysiert die hergestellten Verbindungen der allgemeinen Formeln III und V als Rohprodukt, während die Verbindungen der allgemeinen Formeln IV und VI nach bekannten Methoden gereinigt werden, im allgemeinen durch Adsorption an einem Kationenaustauscher, anschließende Elution mit verdünnter wässriger Ammoniaklösung sowie nachfolgende Umkristallisation der Rohprodukte aus Ethanol/Wasser.

Unter den Verbindungen der allgemeinen Formeln III, IV, V und VI ist lediglich eine bekannt (Nicotianamin: VI, $R^1 + R^2 = -(CH_2)_2-$, $n_1 = n_2 = 1$), alle anderen sind neu. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine gezielte und systematische Veränderung des Nicotianamin-Moleküls. Gegenüber der bekannten Synthese für Nicotianamin besitzt das neue Verfahren folgende Vorteile:

- Der verwendete Aldehyd der allgemeinen Formel II ist in wesentlich weniger Syntheseschritten zugänglich.
- Durch Einsatz einer anderen Schutzgruppentechnik ist eine Verknüpfung von Aldehyd- und Aminkomponenten durch katalytische Hydrierung möglich.
- Die Reinigung der Reaktionsprodukte erfolgt auf einfache Weise.

Auch für die Herstellung radioaktiv markierter Polyaminosäuren, beispielsweise ^{14}C -markierter Verbindungen, ist das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

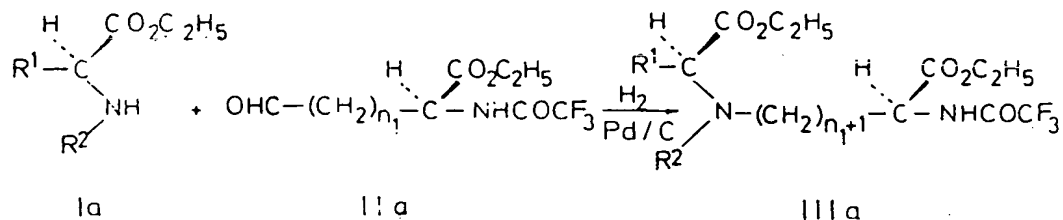
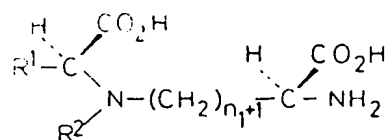
Neben Nicotianamin zeichnen sich auch strukturell analoge Polyaminosäuren der allgemeinen Formel VI durch biologische Aktivität aus. Im Vordergrund stehen dabei chelierende Eigenschaften für Metalle, z. B. Eisen, Kupfer, Zink, Mangan. Infolge dieser Eigenschaften wirken Nicotianamin und nicotianaminanalogue Polyaminosäuren als Carrier in höheren Pflanzen. Das neue Verfahren ermöglicht die Herstellung solcher Nicotianamin-Analoga mit veränderter biologischer Aktivität, die für die Untersuchung von Biosynthese, Metabolismus, Transport, Verteilung, Wirkungsweise und Struktur-Wirkungs-Analyse des Verbindungstyps als Basis für die Entwicklung neuer Wirkstoffe benötigt werden. Durch die Erfindung werden neue Metall-Carrier bereitgestellt, die geeignet sind, z. B. spezifische Eisenmangelkrankungen (Eisenchlorosen) in land-, garten- oder forstwirtschaftlichen Kulturen zu beseitigen. Unter den erfindungsgemäß herstellbaren Verbindungen befinden sich solche, bei denen die benötigte Aufwandmenge zur Erzielung des gewünschten Effektes in der gleichen Größenordnung liegt wie die wirksame Menge bei Phytohormonen. Die

Polyaminosäuren der allgemeinen Formel VI sind auch für die Medizin von Interesse, z. B. zur Therapie von Hämosiderosen oder idiopathischen Hämochromatosen.

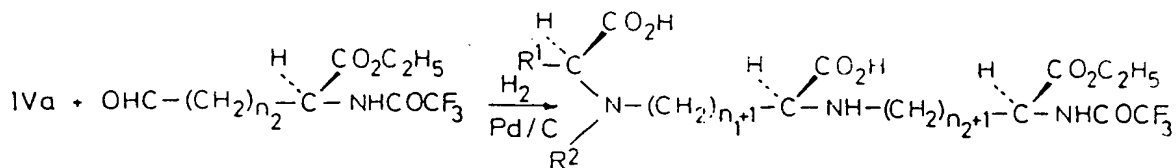
Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung, wobei die darin angegebenen speziellen Bedingungen die Erfindung nicht einschränken.

Ausführungsbeispiele

Eine Auswahl von Verbindungen, die man mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens herstellt, enthält das folgende Formelschema.

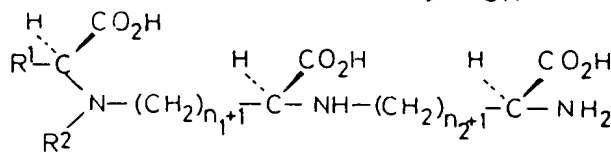
Formelschema zu den BeispielenOH⁻ oder H⁺

IVa



IIb

Va

OH⁻

VIa

Ia, IIIa, IVa, Va, VIa	R ¹	R ²	n ₁	n ₂
1	—(CH ₂) ₂ —		1	1
2	—(CH ₂) ₃ —		1	1
3	—(CH ₂) ₄ —		1	1
4	—(CH ₂) ₂ —		2	1
5	—(CH ₂) ₂ —		1	2
6	—(CH ₂) ₂ —		2	2
7	H	H	1	1
8	C ₂ H ₅	H	1	1

Im folgenden wird beispielhaft auf die Herstellung der Verbindungen 2 (vgl. Formelschema) der allgemeinen Formeln IIIa, IVa, Va und VIa eingegangen.

- Synthese von (2S:3'S:3''S)-N- γ -(3-Amino-3-carboxypropyl-amino)-3-carboxypropyl γ -prolin (VIa/2)

573 mg (4 mmol) S-Prolinethylester (Ia/2) werden mit 965 mg (4 mmol) (3S)-3-Ethoxycarbonyl-3-trifluoracetylaminopropionaldehyd (IIa, $n_1 = 1$) in 30 ml trockenem Ethanol bei Normaldruck und Raumtemperatur eine Stunde lang in Gegenwart von 1 g Pd/C (10 % Pd) katalytisch hydriert. Die Reaktionslösung wird vom Katalysator abfiltriert und i. Vak. eingeeengt. Zur Entfernung der Schutzgruppen kann alkalisch oder sauer hydrolysiert werden.

Alkalische Hydrolyse: Der Rückstand wird in 50 ml 1 %iger wäßrig-ethanolischer KOH gelöst und die Lösung nach 20 Stunden auf eine Ionenaustauschersäule (Dowex 50 WX 4, 100 - 200 mesh, Beladung: H^+) gegeben. Nach Waschen mit Wasser wird mit 2 N NH_3 -Lösung eluiert. Einengen der Lösung i. Vak. liefert 767 mg Rohprodukt. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisieren aus Ethanol/Wasser = 9 : 1 oder durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Partikelgröße 63 - 200 μm). Es wird zuerst mit Ethanol gewaschen und anschließend mit Ethanol/Wasser = 1 : 1 eluiert. Zur Entfernung von Kieselgel werden die Verbindung IVa/2 enthaltenden Fraktionen auf eine Kationenaustauschersäule (siehe oben) gegeben, mit Wasser gewaschen und mit 2 N NH_3 -Lösung eluiert. Einengen der Lösung gibt 482 mg (51 % d. Th.) eines weißen, amorphen Produktes. Die Verbindung ist DC-rein und kann ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet werden.

Saure Hydrolyse: Der Reaktionsrückstand wird in 10 ml Ethanol gelöst und mit 2 mal 20 ml 18 %iger Salzsäure (2. Zugabe nach 15 Min.) 30 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen, auf eine Kationenaustauschersäule (siehe oben) gegeben, mit Wasser gewaschen und mit 2 N NH_3 -Lösung eluiert. Dann wird erneut eingedampft und mehrmals Ethanol nachdestilliert. Zum

Rückstand wird Ethanol gegeben und filtriert. Es hinterbleiben 519 mg weißes, DC-reines Produkt. Einengen des Filtrats und Wiederholung der Hydrolyseprozedur liefert weitere 61 mg der Verbindung IVa/2 (Gesamtausbeute: 580 mg = 62 % d. Th.). Die Verbindung liegt als Monohydrat vor.

Schmp.: $> 190^{\circ}\text{C}$ Zers. (umkrist. aus Ethanol/Wasser = 9 : 1)
R_F: 0,34 (DC auf Silufol mit n-Propanol/Wasser = 6 : 7,
Nachweis mit Ninhydrin)

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -49,5^{\circ} (c = 1,0; \text{H}_2\text{O}).$$

117 mg (0,5 mmol) IVa/2 werden mit 121 mg (0,5 mmol) Aldehyd (IIb, $n_2 = 1$) und 0,5 ml Triethylamin in 30 ml Methanol in Gegenwart von 100 mg Pd/C (10 % Pd) bei Normaldruck und Raumtemperatur 5 Stunden lang hydriert. Es wird vom Katalysator abfiltriert und i. Vak. eingengt. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt durch alkalische Hydrolyse. Hierzu wird der Rückstand mit 20 ml 1 N wäBr. KOH behandelt. Nach 30 Min. wird die Reaktionslösung auf eine Kationenaustauschersäule (Dowex 50 WX 4, 100 - 200 mesh) gegeben, mit Wasser gewaschen und mit 2 N NH_3 -Lösung eluiert. Einengen der Lösung gibt 133 mg Rohprodukt, das aus Ethanol/Wasser umkristallisiert wird. Verbindung VIa/2 liegt als Trihydrat vor.

Ausbeute: 112 mg (60 % d. Th.).

Schmp.: $> 220^{\circ}\text{C}$ Zers.

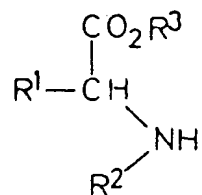
R_F: 0,28 (Silufol, n-Propanol/Wasser = 6 : 7, Ninhydrin)

$$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -26,7^{\circ} (c = 0,44; \text{H}_2\text{O}).$$

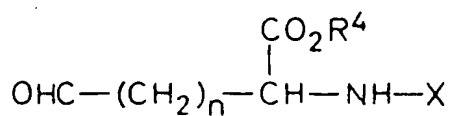
Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Polyaminosäuren, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch eines Aminosäureesters der allgemeinen Formel I und eines Aldehydes der allgemeinen Formel II katalytisch hydriert wird, von der entstandenen Verbindung der allgemeinen Formel III die Schutzgruppen durch alkalische oder saure Hydrolyse entfernt werden, die so erhaltene Verbindung der allgemeinen Formel IV zusammen mit einem Aldehyd der allgemeinen Formel II in Gegenwart einer Base durch katalytische Hydrierung zur Verbindung der allgemeinen Formel V umgesetzt und diese alkalisch zur entsprechenden Verbindung der allgemeinen Formel VI hydrolysiert wird, wobei in den Formeln I bis VI R^1 und R^2 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder Alkyl ($C_1 - C_4$) bzw. gemeinsam für Polymethylen ($C_2 - C_5$), R^3 für niederes Alkyl, R^4 für Alkyl ($C_2 - C_4$) und n für n_1 oder n_2 stehen, dabei n_1 und n_2 unabhängig voneinander 1, 2, 3 oder 4 bedeuten, und X eine Schutzgruppe symbolisiert, die bei der Verknüpfung von Aldehyd- und Aminokomponenten durch katalytische Hydrierung nicht abgespalten wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß X einen Trifluoracetylrest symbolisiert.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrierungen bei Raumtemperatur unter Normaldruck in einem organischen Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch durchgeführt werden und als Katalysator Palladium auf Aktivkohle eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Punkt 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel Alkohole verwendet werden.

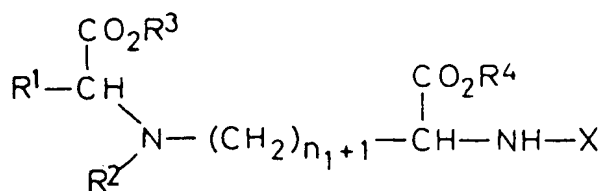
5. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Umsetzung der Verbindungen der allgemeinen Formel IV zu den Verbindungen der allgemeinen Formel V als Base eine tertiäre Stickstoffbase verwendet wird.
6. Verfahren nach Punkt 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß n_1 und n_2 unabhängig voneinander für 1 oder 2 stehen.



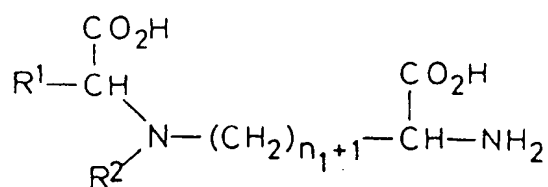
I



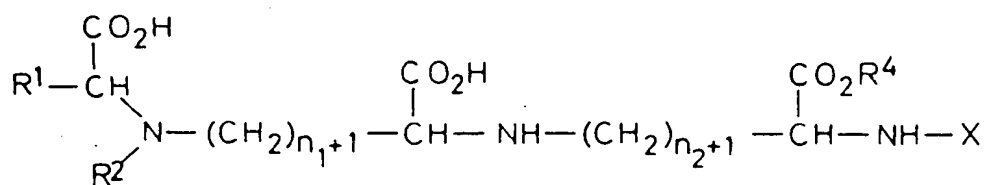
II



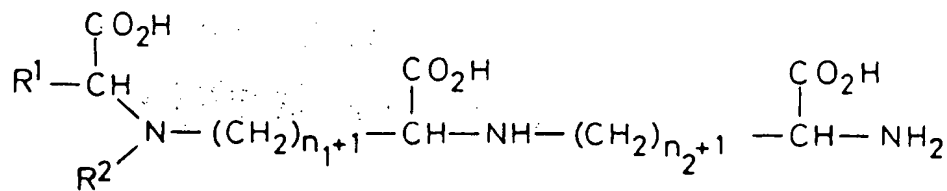
III



IV



V



VI